

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-218466
 (43)Date of publication of application : 26.09.1991

(51)Int.Cl.

601N 33/579
 A23K 1/16
 A23L 1/03
 A23L 1/30
 A23L 2/00
 A61K 7/00
 A61K 37/20
 // C12P 19/04
 (C12P 19/04
 C12R 1:89)
 (C12P 19/04
 C12R 1:645)

(21)Application number : 02-025192

(71)Applicant : CHIBA SEIFUN KK
 MIZUNO DENICHI
 SOMA GENICHIRO

(22)Date of filing : 06.02.1990

(72)Inventor : SOMA GENICHIRO
 YOSHIMURA ATSUSHI
 TSUKIOKA DAISUKE
 MIZUNO DENICHI
 OSHIMA HARUYUKI

(30)Priority

Priority number : 64 25739
 01255210Priority date : 06.02.1989
 02.10.1989Priority country : JP
 JP

(54) PLANT GLYCOLIPID POSITIVE IN LIMULUS TEST, IMMUNE FUNCTION ACTIVATOR, IMMUNE FUNCTION ACTIVATOR FOR ANIMAL, IMMUNE FUNCTION INSPECTING DRUG, IMMUNE FUNCTION INSPECTING DRUG FOR ANIMAL, NON-PHARMACEUTICALS, COSMETICS, FOOD, FUNCTIONAL FOOD, DRINKS, FEED CONTAINING SUCH GLYCOLYPID

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the immune function activator which has large activatability and chemotherapy coefft. and can be dosed in various manners by separating the plant glycolipid positive in Limulus test having specific properties from the plants which man and animal eat normally and refining this glycolipid.

CONSTITUTION: Raw material plants, such as gymnosperm, Monocotyledoneae and Dicotyledoneae, are chopped, dried and crushed at need and thereafter, the plants are suspended in distilled water. The supernatant is recovered and the fractions of $\leq 5,000$ mol.wt. are filtered away. The resulted dry matter is suspended in distilled water to make 50mg/ml and the

suspension is centrifugally separated. The supernatant is recovered. An acid and alkali are alternately added thereto, then the settling and recovering of the supernatant are repeated. The finally recovered supernatant is neutralized with an alkali and is thickened. The concn. soln. is gel-filtered. The plant glycolipid positive in Limulus test which has about $8,000 \pm 1,000$ mol.wt. of 90% purity product by an SDS electrophoresis method, ≥ 1 phosphorus number per molecule, and respectively 6 ± 2 hexosamine number and fatty acid number is recovered. This glycolipid is used as it is or is used by diluting the same to an arbitrary extent and is effective as an oral drug, injection or embrocation. The preservable property thereof is enhanced when prepd. as dry powder.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁 (JP) ⑪ 特許出願公開
 ⑫ 公開特許公報 (A) 平3-218466

⑬ Int. Cl. 1 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 平成3年(1991)9月26日
 G 01 N 33/579 304 C 9015-2G
 A 23 K 1/16 7110-2B
 A 23 L 1/03 6977-4B ※
 審査請求 未請求 請求項の数 23 (全24頁)

⑮ 発明の名称 リムラステスト陽性植物糖脂質、それらを含む免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤、免疫機能検査薬、動物用免疫機能検査薬、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、飼料

⑯ 特 願 平2-25192

⑰ 出 願 平2(1990)2月6日

優先権主張 ⑯ 平1(1989)2月6日 ⑯ 日本 (JP) ⑯ 特願 平1-25739

⑯ 発明者 桜 源一郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21
 ⑯ 発明者 吉 村 淳 千葉県千葉市磯辺3-26-7
 ⑯ 発明者 月 岡 大輔 千葉県千葉市春日1-21-17
 ⑯ 出願人 千葉製粉株式会社 千葉県千葉市新港17番地
 ⑯ 出願人 水 野 伝一 神奈川県鎌倉市岡本18
 ⑯ 出願人 桜 源一郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21

最終頁に統く

明細書

1 発明の名称

リムラステスト陽性植物糖脂質、それらを含む免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤、免疫機能検査薬、動物用免疫機能検査薬、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、飼料

2 特許請求の範囲

(1) 次の物性を有するリムラステスト陽性植物糖脂質。

分子量: 8,000 ± 1,000 (SDS電気泳動法)

リン数: 1 以上 / 分子

ヘキササミン数: 6 ± 2 / 分子

脂肪酸数: 6 ± 2 / 分子

(2) 植物が單子葉植物、雙子葉植物、双子葉植物、シダ植物、ソウ群、薔薇及びそれらの混合物からなる群から選択されるものである、請求項1記載のリムラステスト陽性植物糖脂質。

(3) 單子葉植物がイネ科植物である、請求項2記載のリムラステスト陽性植物糖脂質。

(4) イネ科植物がイキである、請求項3記載のリムラステスト陽性植物糖脂質。

(5) イネ科植物が葦である、請求項3記載のリムラステスト陽性植物糖脂質。

(6) 茎が小麦、大麦、蕎麥、からす麦、えん麦及びそれらの混合物からなる群から選択されるものである、請求項5記載のリムラステスト陽性植物糖脂質。

(7) ソウ類がカツウ類、紅ソウ類、緑ソウ類、ランソウ類及びそれらの混合物からなる群から選択されるものである、請求項2記載のリムラステスト陽性植物糖脂質。

(8) 緑ソウ類がクロレラである、請求項7記載のリムラステスト陽性植物糖脂質。

(9) 蘭類が根子蘭類、子ノウ蘭類及びそれらの混合物からなる群から選択されるものである、請求項2記載のリムラステスト陽性植物糖脂質。

(10) 請求項1記載のリムラステスト陽性植

物質質の少なくとも1種を含む免疫機能活性化剤。

(11) 免疫機能が骨形成促進能である、請求項10記載の免疫機能活性化剤。

(12) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物質の少なくとも1種を含む動物用免疫機能活性化剤。

(13) 免疫機能が骨形成促進能である、請求項12記載の動物用免疫機能活性化剤。

(14) 免疫機能が産卵促進能である、請求項12記載の動物用免疫機能活性化剤。

(15) 免疫機能が卵殻強度増強能である、請求項12記載の動物用免疫機能活性化剤。

(16) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物質の少なくとも1種を含む免疫機能活性化剤。

(17) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物質の少なくとも1種を含む動物用免疫機能活性化剤。

(18) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物質の少なくとも1種を含む医薬部外品。

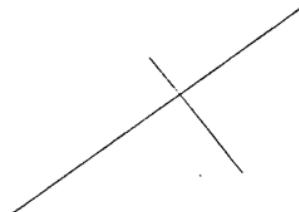
(19) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物質の少なくとも1種を含む化粧品。

(20) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物質の少なくとも1種を含む食品。

(21) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物質の少なくとも1種を含む機能性食品。

(22) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物質の少なくとも1種を含む飲料。

(23) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物質の少なくとも1種を含む料。



3. 角明の詳細な説明

【産業上の利用分野】

本角明は、リムラステスト陽性植物質に関する。

より詳細には、本角明は、リムラステスト陽性植物質及びその少なくとも1種を含む免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤、免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、調味料等に関する。

【従来の技術】

生物には、生体の内部環境が外来性及び内因性の異物によって擾乱されるのを防ぎ、生体の正常性を維持するための免疫機能が働いている。従って、免疫機能の低下は疾患の悪化、各種疾患の発病、老化促進の原因となり、その活性化は健康向上、各種疾患の発病阻止、治療、老化防止につながる。

このため、免疫機能を活性化させる物質の検

が実験されており、現在、PSK【別名クレスチン（興和化学株式会社の登録商標）】、レンチアン（味の素株式会社の登録商標）、ペスタチン（日本化薬株式会社の登録商標）、ソニフィラン（科研製薬株式会社の登録商標）、OK-432【キャンサー ケモセラピー レポートゥ パーティー 1（Cancer Chemotherapy Reports Part 1）、vol. 58, No. 1, 10頁（1972）、別名ビシバニール（中外製薬株式会社の登録商標）】等が知られている。

又、リムラステスト陽性（後で説明する）の植物質としては、大葉蘭LPS（植物多糖体）、百日咳菌LPS、サルモネラ菌LPS等の菌界植物質の存在は知られており、各種実験で利用されているが、毒性が高いために、用途は何ら実用化されていない。リムラステスト陽性植物質についてもその存在する報告されていない。

【発明が解決しようとする課題】

従来の免疫療法活性化剤のうちで、PSK、レンチナン、ベスタチン、ソニフィランにはTNF産生能がないので、それらの免疫療法活性化剤は無い。

一方、OK-432にはTNF産生能があるが、大量投与が必要であることから、発熱、悪寒、血圧低下、血小板減少等の副作用の発生が避けられず、従って化学療法活性化剤が小さい。更に、生産工程に、微生物培養と搾てて処理分離、精製とが含まれるために生産コストが高いという問題点もある。加えて、簡便な経口投与や経皮投与では効果がないので、投与上の便宜に欠ける。

ここで「TNF」とは、マクロファージにより産生される腫瘍壞死因子 (Tumor Necrosis Factor) の略称 [ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (The Journal of Biol. Chem., 280, 2345-2354頁 (1985年)] であり、マクロファージの活性が高まるにつれてその産生量は増していく。「マ

すること、及び、このリムラステスト陽性植物細胞質の少なくとも1種を含む免疫療法活性化剤、動物用免疫療法活性化剤、免疫療法検査薬、動物用免疫療法検査薬、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、肥料等を提供することを目的とする。ここで「少なくとも1種を含む」とは、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質は各別に使用できることはもちろん、その複数個の用法が用意されない限り、それらの2種以上を任意に組み合わせて、又、更には他のいづれの物質とも組み合わせて使用できることを意味する。

【課題を解決するための手段】

原植物

本発明で使用できる原植物は、リムラステストで陽性を示す成分を含むものならばいざれでもよい。例えば、葉子植物、草子葉類、双子葉類、シダ植物、ソウ類、蘭類を個別に或は複合して使用できる。

葉子植物としては、例えば、マツ科植物を使用

クロファージは、免疫担当細胞の一環であり、動物体内のほとんど全ての組織に分布し、粒子状の異物や体内の老死細胞などを捕食して消化する大型のアーバ状細胞の総称である。「化学療法活性化」は、薬剤に対する宿主の最大耐量と、病原菌に対する薬剤の最小有効濃度の比をいい、この比が大きい程すぐれた化学療法剤とされる。

本発明は、これら従来技術の欠点が解消された、高い免疫療法活性化剤を有す、化学療法活性化が大きくかつ生産コストの低い、しかも、静注投与、経口投与、皮膚塗付が可能なリムラステスト陽性植物細胞質を提供するために開発されたものである。ここで「リムラステスト」とは、1988年にレヴィン (Levin) により開発された、カブトガニ血球由来液と免疫合成功能を用いたエンドキシン定量法である。

従って、本発明の目的は、高い免疫療法活性化能を持ち、化学療法活性化が大きくかつ生産コストの低い、しかも、静注投与、経口投与、皮膚投与が可能な、リムラステスト陽性植物細胞質を提供

できる。

單子葉類としては、例えば、イネ科、アヤメ科、ショウガ科、サトイモ科、ユリ科の植物を使用できる。イネ科植物としては、例えば、イネ、麦を用意できる。麦は小麦、大麦、蕎麦、から麦、えん麦その他のいづれの種類でもよく、又、それらの組合物でもよい。

双子葉類としては、例えば、アカキ科、アブラナ科、ウリ科、クスノキ科、クルミ科、コショウ科、セリ科、ツツジ科、ドクダミ科、ナス科、バラ科、マタタビ科、マメ科、ミカン科、モクレン科、ニクズク科の植物を個別に或は複合して使用できる。

シダ植物としては、例えば、トクサ科、ゼンマイ科の植物を個別に或は複合して使用できる。

ソウ類としては、例えば、カツソウ類、紅ソウ類、緑ソウ類、ランソウ類の植物を個別に或は複合して使用できる。緑ソウ類としては、例えばクロレラを使用できる。

蘭類としては、例えば、抱子蘭類、子ノウ蘭類

の操作を個別に或は組合して使用できる。

リムラステスト陽性植物粗脂肪の抽出、定量測定

以上に述べた原料植物中の本発明のリムラステスト陽性植物粗脂肪の抽出、含量測定は、例えば、生化工業株式会社からトキシカラーシステムという名前で市販されている試薬セットを使用して実施できる。即ち、原料植物を同システムのLS-100セットと合わせて発色させ、その色の強さを、同じく同セットのE-100セットを使用して作成した検量線と対比させればよい。

又、本発明のリムラステスト陽性植物粗脂肪は、以下に述べる方法で分離、精製できる。

リムラステスト陽性植物粗脂肪の分離、精製

①原料植物を必要に応じて適宜細切、乾燥、粉砕した後に蒸留水によく懸濁し、上清を回収する。

例えば、原料植物が鱗茎の種子である場合は、種皮をつけたまま、或は、種皮を除いた後に簡単に剥ぐか、又は、食用に供せられている程度の粉末になるまで粉砕し、得られた粉末に水を加えて分散液とし、液体した後に乾燥物を計量又は過心

②得られた乾燥品を、50mg/mlになるよう蒸留水に懸濁し、遠心分離操作に付して上清を回収する。

③この上清を水水で洗却し、酸を添加して酸性にすると沈殿が生じる。この際使用する酸は特定のものである必要はなく、例えば、トリクロロ酢酸（以下、TCAとす）、過塩素酸、トリフルオロ酢酸、酢酸、ジクロロ酢酸を使用できる。

④次いで、遠心分離操作に付して沈殿を回収して蒸留水で洗浄し、再度遠心分離操作に付して沈殿を回収する。

⑤沈殿を蒸留水に懸濁し、沈殿が溶解するまでアルカリを加える。この際使用するアルカリも特定のものである必要はなく、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、炭酸ナトリウム、酢酸ナトリウムを使用できる。沈殿の溶解時に強酸性がpH1より大きくなると目的の蛋白質が失活するので注意が必要である。

⑥次いで酸を加えてpH8としてから37℃に加温し、更に酸を加えて酸性にすると沈殿が生ずる。

分離により除去するか、粉末に水を加えて溶てて体られるドウをミキサーでゆるやかに水成し、沈降物を除去すればよい。

この抽出操作の際の種子の粒度、水の温度、酸性、添加量、操作の速度、時間、遠心分離の際の条件等は特に制限する必要はない。しかし、便宜上、抽出水の温度は、乾燥種子に含まれる脂肪の融化を招かない50℃以下とすることが好ましい。又、水の添加量は、乾燥の種類、粒度により異なるが、乾燥種子の割合が70w/v%以下、直ましくは20~50w/v%程度とすると操作上便宜である。更に、操作の速度は、起泡を引き起こさない程度のものとすることが好ましい。なお、この段階の操作段階で、本発明のリムラステスト陽性植物粗脂肪の純度は、リムラステスト活性データから判断して、例えば小麦種子の場合には約30倍に上昇する。

⑦純度を更に上げるためにには、この上清を常法に従って紫外線に付して分子量5,000以下の蛋白を除去すればよい。

るので、37℃に保温した遠心分離管を使用して遠心分離操作に付す。なお、この際使用する酸も特定のものである必要はない。

⑧上清を回収して氷冷し、4℃で再び遠心分離操作に付す。

⑨上清を回収し、アルカリを添加して中和し、常法に従って紫外線で高離する。この際使用するアルカリも特定のものである必要はない。

⑩次いで常法に従ってゲル過濾に付して、リムラステスト陽性蛋白を回収して併せる。ゲル過濾用の担体としては、例えばセファデックス

（Sephadex）G-75、G-100、セファクリル（Sephadryl）S-200、セファロース（Sephadrose）BB【以上は米国ファルマシア社（Pharmacia Inc.）製】、バイオゲル（Biogel）P-100【バイオラッド（Biolograd Inc.）社製】、トーヨーバーレルHW-50、HW-55【東洋曹達工業社製】を使用できる。担体はpH3~10のものならいずれでもよい。

例えば、トリス- HCl 又はリン酸緩衝液を使用できる。

④次いでこの部分に蛋白分解酵素を加え、37度で2時間以上インキュベーションして残存蛋白質を分解し、得られた酵素活性液を常法に従って蛋白分解酵素も特定なものである必要はなく、例えば、V8プロテアーゼ、キモトリプシン、トリプシン、サーキュラーゼを単独で、或は任意に組み合わせて使用できる。市販品としては、例えば、プロナーゼB（科研化学社）、プロティニースK（メルク社）を使用できる。

⑤次いでこの部分を常法に従って、例えば、ファルマシア社製のFPLCシステムでファルマシア社製のモノQ-セラロース（Sephadex[®]）、Q-セラロース（Sephadex[®]）を使用して陰イオン交換クロマトグラフィーに付してリムラステスト陽性画分を得る。

⑥次いで、常法に従って既述のためにゲル通過に付してリムラステスト陽性画分を回収する。

性TNF産生促進能、内因性TNF産生能、カーボン除去能、骨形成促進能、産卵促進能、卵胎強化能により確認した。

内因性TNF産生促進能、産生能

動物体内にTNFを産生させるためには、成生前座（ブライミング）段階と産生開始（トリガリング）段階が必要であることは、カースウェル（Carewelli）らにより、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユースエー（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.）72, 3666～3670頁（1975年）に報告されており、その後、各段階で使用出来る薬剤の検討もすみ始めている。ブライミング段階開始のために投与される薬剤が「ブライマー」（内因性TNF産生促進剤）であり、トリガリング段階開始のために投与される薬剤が「トリガー」（内因性TNF産生剤）である。本発明のリムラステスト陽性植物蛋白質は、既にその有用性が確立されているビシバニールと同程度にブライマーとして、又、トリガ

以上の操作により、例えば小麦種子の場合には、当活性の約20%が回収され、純度約95%の粗製蛋白質が得られ、又、段階①終了時の純度に比べ約1000倍の純度（小麦種子の場合）になる。リムラステスト陽性植物蛋白質の特性

従って実験例中で詳述する如く、本発明のリムラステスト陽性植物蛋白質の96%純度蛋白質の分子量はおよそ80,000±1,000（SDS電気泳動法）、リン酸は1以上/分子、ヘキソサミンは6±2/分子、西脇数は6±2/分子である。固形の形態

本発明のリムラステスト陽性植物蛋白質はそのまま、或いは任意の程度に希釈した形で提供できる。又、保存性を高めるために、液状乾燥や噴霧乾燥などの任意の手段により乾燥粉末として提供することもできる。これらはいずれも常法で生産できる。

免疫活性化能の測定

本発明のリムラステスト陽性植物蛋白質の免疫活性化能は、マクロファージ活性を用いての内因

性TNF活性を測定する。

TNF活性は、L-929細胞（プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユースエー 72, 3666～3670頁）に対する細胞毒性を基にして、次のようにして測定する。

3-8-2 細胞を5%仔牛児血清を加えたイーグルミニマムエッセンシャル培地（以下、MEM培地と表す）で育成し、8×10⁴個の細胞が100mlの両上培地に含まれる様にし、96穴の平底プレートで育成する。育成条件は37℃、2時間、5%CO₂、濃度100%であり、通常の細胞培養に用いられる方法でよい。その後、アクチノマイシンDを培地中に約濃度1μg/mlとなる様に加え、培養液の液量を150μlとする。即ちに、液体を適当にMEM培地で稀釈したものと50μl加える（この稀釈率を適宜調節し、ED₅₀を求める事ができる）。更に、最終液量200μlとなつたL929細胞を上記条件で18時間培養する。

細胞障害活性を測定するには、まず全培地を除去し、ついで 0.1% クリスタルバイオレットを含む 1% メチルアルコール溶液を加えて固定染色する。クリスタルバイオレットは全有核細胞を染色するが、死細胞は染色後にブレート底面より水洗で除去されるので、生存細胞の結果から細胞障害活性を直接測定できる。この染色度を

OD_{540nm} での吸光度を指標として測定し、对照群に対する染色度と比較する事で細胞障害活性を測定する。活性の定義は次の様に行う。

SH 20 種群が 50% 生存できる細胞の種種率 (N) を求める。対照としてウサギ TNS [種種障害血清 (Tumor Necrosis Serum)] を使用し、このウサギ TNS の活性 n (単位 / ml) を 2.4×10^4 単位 / mg / ml の TNF- α を用いて決定する。このウサギ TNS の ED₅₀ を与える種種率 (C) を求める。

種種活性 (単位 / ml) は $\frac{N}{C} \times n$ で計算する。

カーボン除去能

コロイド状カーボンの血中からの除去がマクロファージ活性の指標となることは古くから知られている (日本国学会教育委員会編、細胞生物学講義 5 「マクロファージの機能と機能測定法」、98 頁、昭和 60 年 (株) 黄版出版発行) 。従つて、キャンサー リサーチ (Cancer Research) , 28, 1968 年 8 月号の 1531 ~ 1532 誌載の方法に準拠し、静止されたカーボンの除去率を指標に、皮膚投与されたリムラステスト陽性植物細胞質の免疫活性化能を測定する。

骨形成促進能

骨細胞活性化試験で確認する。

骨細胞は、骨組織中の古い骨をこわす骨吸収担当細胞である。骨細胞の活性化により代償的に骨芽細胞が活性化され、骨形成が骨吸収よりも優位の状態になる結果、骨形成が促進されると考えられる。

破骨細胞活性化試験では、黒猩猩重骨を実験試

料として使用する。即ち、黒猩猩重骨を ¹⁴Ca で標識した後に、薬物を含む培地 (处理群) と薬物を含まない培地 (対照群) で別々に培養後に、骨に残存する ¹⁴Ca 量と、培養中に培養中に放出した ¹⁴Ca 量とを測定し、處理群、対照群における ¹⁴Ca 放出率をそれぞれ次式により計算する。

$$\frac{\text{¹⁴Ca 放出量}}{\text{¹⁴Ca 残存量 + ¹⁴Ca 放出量}} \quad \text{薬物の効果は次の T/C 比で表す。}$$

$$\text{T/C 比} = \frac{\text{處理群の ¹⁴Ca 放出率}}{\text{対照群の ¹⁴Ca 放出率}}$$

理論的には、この T/C 比が 1 より大きければ薬物効果があることになる。なお、後記実験所においては、骨細胞のばらつきによる影響を避けるために、同一頭の黒猩猩重骨 (2 本存在する) の一方を対照群で、他方を處理群で使用した。

骨形成能、骨強度強度能

本発明のリムラステスト陽性植物細胞質を投与した日から更に経た日数及びその時の強度を測定することにより確認する。

算算の取引は農林事務次官通達により規制されている。現行の昭和 54 年 12 月 25 日付け改正 54 号 A 第 513 号通達によれば、算算はその重量、外観検査、透光検査の結果に基づき等級付けされているが、輸送中、取扱い中、使用中等における算算の破損を防止する目安となる算强度についての記載はない。只、外箱について、「JIS S-1 算强度 B、B 以上のもの」とのみ規定している。しかし、外箱がいくら丈夫であっても、輸送中等の振動、衝撃による算算の破損を防止できないことは古来である。このため、科学やスーパー等の大口需要者と生産者との間には、一定以上の算强度を有する算算のみを取り扱うとする例も少なくなく、その際には、4 kg/cm² 以上であれば申し分ないとされている。

なお、現在のところ、算算强度を高める効果を有する薬剤、肥料等の開発、販売は知られていない。

リムラステスト陽性植物細胞質の用途

本発明のリムラステスト陽性植物細胞質は種々

な用途に使用できる。

その第1の理由は、原料が人間その他の動物により常食されているものなので、人間その他の動物への投与に当たり考慮すべき問題点が皆無であることがある。

第2の理由は、そのまま、或いは任意の程度に希釈した形で、又、乾燥粉末として提供することもできるので、提供できる形態が極めて多岐に渡っている点にある。

第3の理由は安価であることがある。

このような利点を持つ本発明のリムラステスト陽性植物根茎質の一つの用途は、その免疫機能活性化能をそのまま生かした免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤である。

第2の用途は、その免疫機能活性化能を指標にして人間その他の動物の免疫機能をチェックするための免疫機能検査薬、動物用免疫機能検査薬である。

第3の用途は、その免疫機能活性化能の発現を期待して配合される医薬部外品、化粧品、食品、

アーリング) (3, 120 g)を入れ、2.03 gの蒸留水を加えて10分間振ってドウとした。15分間の静置後は10 Lの水を加えてゆるやかに搅拌してデンプン乳液を洗い出し、同時に可溶性成分を溶出させた。この溶出液を5℃の冷蔵庫中で12時間静置したのちデンプン等の沈降物を除去した。上澄み液を濾過乾燥して201.1 gの粉末を得た(粉末A)。

更に、残留ドウに5 Lの蒸留水を加えてゆるやかに搅拌し、以下、上記と同様に処理して40.1 gの粉末を得た(粉末B)。

②これら粉末A、Bをアミコン社製耐外壁透湿HF-Lab Iに供し、分子量区分5,000について中空系カートリッジHF-Lab I PM5を、分子量区分10,000については中空系カートリッジHF-Lab I PM10を取り付け耐外壁透湿を行った[温度5~10℃、入圧2.5 psi (1.76 kg/cm²)、出圧1 psi (1.06 kg/cm²)]。その結果に基づき、各区分を次のように命名した。

機能性食品、飲料、肥料等である。例えば、本発明のリムラステスト陽性植物根茎質を配合した化粧品は皮膚の老化防止、新陳代謝促進に役立つので、亦に、又、末長く皮膚を新鮮に保つのに役立つ。

提供できる剤の製造方法

これら免疫機能活性化剤等のいずれもが常法で製造できる。例えば、免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤は医薬或は動物薬製造の常法に従って、経口剤として、或いは静注液、静注液として製造し、或いは粉剤との配合剤として製造できる。又、皮膚にはマクロフンジングが多いので、皮膚塗布剤として投与するとより高い効果が得られる。

以下、実験例、実験例により本発明を更に詳細に説明する。

実験例1

①小型ニードルに、1.08%の灰分を含む根茎小麦粉(アメリカ又はカナダ産のハードレットス

粉末A: 分子量5,000以下の部分をa;

分子量5,000以上の部分をb;

粉末B: 分子量5,000以下の部分をb;

分子量5,000以上の部分をb;

粉末A: 分子量10,000以下の部分をa;

分子量10,000以上の部分をb;

粉末B: 分子量10,000以下の部分をb;

分子量10,000以上の部分をb;

これら各区分を後記実験例1に詳述する方法に従ってリムラステストに付したら、分子量5,000以上の部分には多量のリムラステスト陽性成分が存在するが、分子量5,000以下の部分にはほとんど存在しないことが確認された。

②上記粉末a:の30 gを1 L三角フラスコに入れ、600 mLの蒸留水を注いで、60分間スターーで搅拌した後、日立冷却高速遠心機SCR-20B(ローターRPR16を最前に4℃に冷却しておいた)で4℃で遠心分離操作(10,000 g×10分)に行して上清を回収した。

④この上清を 1/4 三角フラスコに入れ、氷浴下（液温約2°C）、スクリーラーで攪拌しながら、室温に2°Cに冷却してあった100%TCA水溶液20.5mlを滴下し、滴下終了後水温中に10分間放置した。

⑤次いで前記と同様にして4°Cで遠心分離操作（10,000g×10分）に付して沈殿を回収し、氷水中で冷却下、300mlの蒸留水と共に500mlのビーカーに入れて懸濁し、氷水中で冷却し、前記と同様にして4°Cで遠心分離操作（10,000g×10分）に付して沈殿を回収した。

⑥この沈殿を 1/4 ビーカーに入れ、蒸留水50.0mlで懸濁し、1N水酸化ナトリウム溶液約3.5mlを使用して中和（pH7）し、ついで、氷水中で冷却しながら、1N水酸化ナトリウム溶液約2mlを添加して0.02N水酸化ナトリウム溶液になるようにして沈殿を溶解した。

の1N塩酸約1.5mlを加えてpH8とし、次いで100mlの蒸留水を加えた後に1/4 三角フ

ラスコに移して37°Cのインキュベーター内で30分間ゆっくり振盪した。

⑦100%TCA水溶液30mlを加えて混合した後、37°Cのインキュベーター内で10分間ゆっくり振盪してから、約37°Cに保温した遠心分離器トミーCD100R（トミー機器社製）を使用して遠心分離操作（3,000g×10分）に付した。

⑧上清を回収して氷冷し、4°Cで遠心分離操作（10,000g×10分）に付した。

⑨上清を回収して10N水酸化ナトリウム溶液約3.6mlで中和してpH7とし、紫外吸収器（東洋織紙UHP-150、フィルター：UK-10、N₂圧：4.0kg/cm²）で濃縮した。

⑩得られた濃縮液60mlを、セファロース（Sephadex）G-80カラム（米国ファルマシア社（Pharmacia Inc.）製、カラムサイズ：5cm（内径）×100cm（24））を使い、ゲル濃縮（漏斗液：10mMトリス-HCl/10mMNaCl（pH7.5）、

流速：60ml/分）に付して、各20mlの画分を得た。

⑪最初から4-3番目から5-6番目辺の画分28.0mlを併せ、プロナーゼB（科研化学生社）450μgを加え、氷浴下、37°Cに2時間保温した後、紫外吸収器（東洋織紙UHP-62、フィルター：UK-10、N₂圧：4.0kg/cm²）で濃縮した。次いで、ファルマシア社製FPLCシステム（カラム：モノQ HR10/10）を使って陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。即ち、10mMトリス-HCl（pH7.5）と10mMのNaClを含む緩衝液で試料をカラムに付した後、上記緩衝液に更に186mMのNaClを含む組成をした液（200ml）でカラムを洗った。次いで、186mMから1MのNaCl濃度勾配になるようにNaCl濃度を増加させながら全量400mlで目的蛋白質を溶出させ、各2mlの画分を回収した。リムラステスト陽性が確認された、濃度勾配をかけてから6～8番目の画分を併せて、蛋白質純度約92%のB

ml【測定波：3.03ml（リムラステストによる大腸菌LPS検査値である。以下の諸諸質量も全てこの検査値である）、総：0.23ml、蛋白：0.04mg】を回収した。

⑫次いでその8mlを、セファデックス（Sephadex）G-25【カラム：2.0cm（内径）×20.2cm（86ml）】を使ってゲル濃縮（漏斗液：水）に付して各3mlの画分を回収した。リムラステスト陽性された第9～12番目の画分を併せて、蛋白質純度約95%の1.2ml（測定質：2.7mg、総：0.18mg、蛋白：0.03mg）を回収した。総はフェノール-硫酸法で、蛋白はローリー法で測定した。なお、この画分は、陰イオン交換クロマトグラフィーにより陰性であることを確認した。又、SDSゲル電気泳動法による分子量は6,000～10,000だった。

上記画分を-80°Cで凍結後に恒温になるまで凍結乾燥し、重錠を測定したら0.75mlであった。（以下、この凍結乾燥品をCHFと称す）

このCHFのリムラス活性を後記実験附記載の方法で測定したら $2 \cdot 7 \text{ mg}$ に相当するので、その比活性は $2 \cdot 7 + 0 \cdot 75 = 3 \cdot 6$ になる。また、以上の結果で、実験物として存在し得る单体の量は実質上全て除去されたと考えられるので、検出された量は全て、標的物であるCHFを構成している量と考えられる。従って、この段階でのCHFの純度を重量に基づいて計算すると、蛋白 $= 0 \cdot 03 \text{ mg}$ 、粗脂肪 $= 0 \cdot 75 - 0 \cdot 03 = 0 \cdot 72 \text{ mg}$ だから、

$$0 \cdot 72 + 0 \cdot 75 \times 100 = 96\% \text{ である。}$$

CHFの性質

④分子量

CHFを蒸留水に溶解して $1 \text{ mg}/\text{ml}$ 濃度を調製し、その $4 \mu\text{l}$ を $1 \cdot 5 \text{ ml}$ のトレリチュアに入れた。これに、別途、 1 mM のEDTAに $2 \cdot 5\%$ SDS、 6% メルカプトエタノール、 10 mM トリス塩酸 (pH 8.0) を加えて調製したSDS界面活性剤を加え、この溶液を3分間蒸留水に注した。ファルマシア社製のファスト

システム (Phast System) を使用し、電極との間に SDS-バッファー-ストリップ (Buffer Strip) (ファルマシア社製) が介在せられた $1 \mu\text{l}$ の上記溶液をゲル [ファルマシア社製のファスト ゲル グラディエント (Phast Gel Gradient 8-25)] に塗り、最大電圧 250 V 、最大電流 10 mA にセットして泳動を開始させた。泳動終了後、クマシ-染色と銀染色における挙動を観察した。

クマシ-染色では、染色液としてファルマシア製の $0 \cdot 1\%$ ファスト ゲル ブルー (Phast Gel Blue) Rを、脱色液として、メタノール: 蒸留水 (容量比 3:1:6) 混液を使用し、次の順序で染色、脱色を行った。

1) 50°C で 8 分間染色

2) 60°C で 5 分間脱色

3) 50°C で 8 分間染色

4) 60°C で 10 分間脱色

5) 50°C で 5 分間保護 (グリセロール、蒸留、

蒸留水の容量比 5:10:8.5 混液)

6)乾燥

銀染色は、次の順序で行った。

1) 50°C で 2 分間、洗浄液 (エタノール、蒸留、蒸留水の容量比 5:1:4 混液) で処理

2) 50°C で 2 分間、洗浄液 (エタノール、蒸留、蒸留水の容量比 10:5:8.5 混液) で処理

3) 50°C で 4 分間、洗浄液 (エタノール、蒸留、蒸留水の容量比 10:5:8.5 混液) で処理

4) 50°C で 6 分間、銀感液 (8.3% グルタルジアルデヒド) で処理

5) 50°C で 3 分間、洗浄液 (エタノール、蒸留、蒸留水の容量比 10:5:8.5 混液) で処理

6) 50°C で 5 分間、洗浄液 (エタノール、蒸留、蒸留水の容量比 10:5:8.5 混液) で処理

7) 50°C で 2 分間、洗浄液 (脱イオン水) で処理

8) 50°C で 2 分間、洗浄液 (脱イオン水) で処理

9) 40°C で 13 分間、 $0 \cdot 25 \text{ w}/\text{v}\%$ 銀感液

で処理

10) 30°C で 30 秒間、洗浄液 (脱イオン水) で処理

11) 30°C で 30 秒間、洗浄液 (脱イオン水) で処理

12) 30°C で 30 秒間、現像液 ($0 \cdot 04 \text{ v}/\text{v}$ % ホルムアルデヒド + $2 \cdot 5 \text{ w}/\text{v}\%$ 銀感ナトリウム洗浄液) で処理

13) 30°C で 4 分間、現像液 ($0 \cdot 04 \text{ v}/\text{v}$ % ホルムアルデヒド + $2 \cdot 5 \text{ w}/\text{v}\%$ 銀感ナトリウム洗浄液) で処理

14) 50°C で 2 分間、反応停止液 ($5\% \text{ v}/\text{v}$ 銀液) で処理

15) 50°C で 3 分間、保護液 (醇酸、グリセロール、蒸留水の容量比 10:8:8.5 混液) で処理

16)乾燥

銀感液は銀染色に染まるが、クマシ-染色には染まらない性質を利用して染色帯を観察したら、分子量 $8,000 \pm 1,000$ の位置にCHFの

主要染色帯が検出された。同様にして大腸菌LPSの染色帯を観察したら、階段状に連続する染色帯が観察され、染色強度が最高の染色帯の分子量は $30,000 \pm 5,000$ であると推論された。百日咳菌LPSでは、分子量 $8,000 \pm 1,000$ と $9,000 \pm 1,000$ の位置に染色強度が最高の染色帯が観察された。

④ リン含有量

チェントリリバラ (Chen-Toribara) 法 [チェン等著、『アナリティカル・ケミストリ (Analytical Chemistry)』、vol. 28、1756~1758頁 (1966年)]に準拠して次の通りに行った。

CHFを蒸留水に溶解して、 $25 \mu\text{g}$ のCHFを含む $20 \mu\text{l}$ の溶液を調製し、小試験管に入れ、 $20 \mu\text{l}$ の $50\text{V}/\text{v}$ 硫酸を添加し、 160°C で2時間加熱した。次いで、 $20 \mu\text{l}$ の $10\text{V}/\text{v}$ 過塩素酸を添加した後にガスバーナーで1分間加熱して灰化させた。その後に 0.5mL の蒸留水、次いで 0.5mL の反応試薬 (1mL

のBN液、 2mL の蒸留水、 2mL の $2.5\text{V}/\text{w}$ %モリブデン酸アンモニウム及び 1mL の $10\text{V}/\text{w}$ %のアスコルビン酸を混和して調製し、その 0.5mL を使用)を添加して室温で30分間放置した後に、 820nm での吸光度 ($\text{OD}_{820\text{nm}}$)を測定した。なお、検量線作成用の試料としては、リン酸二水素カリウム (和光純薬社製)を蒸留水で希釈し、リン量としてそれ $2.5 \mu\text{g}$ 、 $1 \mu\text{g}$ 、 $0.25 \mu\text{g}$ 、 $0.05 \mu\text{g}$ を含む 0.5mL の溶液を調製して使用した。なお、リン $1 \mu\text{g}$ はリン酸二水素カリウム 4.3g に相当する。得られた結果を次表1に示す。

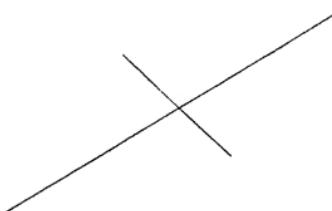


表 1

OD _{820nm}	液体
0.002	リン酸二水素カリウム (リン換算値: μg)
0.150	0
0.620	0.25
1.659	1.0
	CHF (4種類) (検量線から計算した リンの重量: μg)
0.036	2.5
0.073	0.1
0.104	0.2
0.139	0.3
	0.4

注: CHFのデータは、無機リンの混入 (例えば、リン酸鉄鉱粉に由来する) による誤差を避けるために、加熱処理をしていない対照のデータを絞じた値である。

CHFの分子量を $8,000$ と仮定し、上表の結果に基づいてCHFの1分子当たりのリン数を次式により計算すると1~4になる。

$$\text{リン量} \times 10^{-4} \times \frac{\text{分子量}}{25 \times 10^{-4}} \times \frac{1}{32}$$

上記実験でリン数が1~4と実験している原因の1つとしては、前駆段階でのモノフォスファエステラーゼの混入により、リン酸が脱離したことにも考えられる。

同様にして求められた大腸菌LPS、百日咳菌LPS (分子量はそれぞれ $30,000$ と $8,000$ に仮定) の1分子当たりのリン数はそれぞれ約1.2個、5個であった。

⑤ ヘキソサミン含有量

エルソン-モルガン (Elson-Moran) 法 (東京化学開発出版「生化学実験法」No. 4の377~379頁) に準拠して次の通りに行った。

CHFを蒸留水に溶解して $1 \text{mg}/\text{mL}$ の溶液を調製し、その $100 \mu\text{l}$ をスクリューキャップ

特開平3-218466 (11)

定された大陽面LPS(仮定分子量30,000)、百日味面LPS(仮定分子量8,000)のヘキソサミン数はそれぞれ4.5±6/分子、1.6±2/分子だった。

ウレア結合有無

9.0μlのCHF底留水溶液(1mg/ml)に1.0μlの内部標準(0.55mMのマルガリノール)を加えた後、1.05°Cで1.5時間加熱し、次いで冷水で冷却した。次いで、1.00μlを分取し、670μlの9.6%エタノールを加え、更に、67μlの下記試薬Bを加えた後に室温で1時間放置し、535nmで吸光度を測定した。検量線作成用試料としては0.20~2.00μg/mlのN-アセチルグルコサミン(和光純薬社製)を使用した。

(試薬A) 7.5μlのアセチルアセトンと2.5mMの1.25N硫酸ナトリウムを混合して試薬(B) 1.6gのページメチルベンズアルデヒドと3.0mlの濃度が3.0mlの9.6%エタノールを混合して試薬。

結果、CHFのヘキソサミン数は8±2/分子(仮定分子量8,000)だった。同様にして測

としては、第一化学薬品社製の合成リビドAである大陽面LPS-15-PP(分子量2,000)で、1分子中の脂肪酸数は6であることが知られている)を用いた。

結果、CHFの脂肪酸数は6±2/分子(仮定分子量8,000)であると推定された。同様にして推定された大陽面LPS(仮定分子量30,000)、百日味面LPS(仮定分子量8,000)の脂肪酸数はそれぞれ1.8/分子、5/分子だった。

上記ガスクロマトグラフィーで経験されたチャートを添付図面第1~3図に示す。第1図はCHFの、第2図は大陽面LPSの、第3図は百日味面LPSのチャートである。

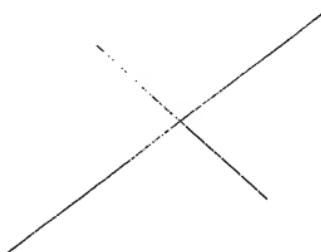
第1~3図において、図示されている主要ピーク番号に対応する保持時間(分)は次の通りであった。

第1図: ピーク番号	保持時間(分)
1	2.450
2	2.758

第2図: ピーク番号	保持時間(分)
1	2.417
2	2.742

第3図: ピーク番号	保持時間(分)
1	2.433
2	3.028

第1~3図の比較により、CHFのチャートは大陽面LPSのチャートに似ているが、百日味面LPSのものとは大きく異なることは明白である。



実験所1 (リムラステスト陽性植物細胞質の定量)

各種植物に含まれるリムラステスト陽性植物細胞質の定量を、生化学工業株式会社のトキシカラーシステムを使って行った。

①96穴の平底または丸底プレートに注射用蒸留水を1穴当たり180μlを入れた。試料20μl (試料が固体の場合には注射用蒸留水に溶解して調製した) をプレートの穴の1つに加えた。プレートをキサレーで攪拌しながらビッティングを行って10倍希釈液を調製した。(以後、順次希釈試料を20μlずつとり、同様に処理することで100倍、1000倍、…と10倍希釈系列液を調製できる。また、注射用蒸留水と試料の量比を変えることにより希釈率は任意に設定できる。)

②内部標準として1.5μg/miの大腸菌PS溶液の100,000倍希釈液を調製し、希釈やリムラステスト発色が正常であることを確認した。

③上記の10倍希釈液35μlを別のプレートの穴にとり、生化学工業株式会社のトキシカラ

ーシステムのLS-1セット35μlを添加し、37°Cで30分間放置した。ついで105μlの1M酢酸水を加えて攪拌して反応を停止させた。この試料液の成長415nmでの吸光度を、96穴用吸光度計プレートリーダーMTP-100 (コロナ電気株式会社製) で測定した。バックグランドとしては蒸留水を、検量線作成用としては42.5pg/miの生化学工業株式会社のトキシカラーシステムのET-1セットを使用して検量線を作成し、この検量線を基礎にして各試料中のリムラステスト陽性細胞質の定量を行った。(試料が蒸留水である場合の吸光度を0とした。)

なお、この方法で标记LS-1セットを使用した場合には1.0~4.5pg/miの範囲内で発色に定量性があることが確認されたので、この範囲に入らないときは、希釈率を変えて再実験した。希釈試料の定量値は、

(検量線から読み取った値) × (希釈率)
で計算した。

得られた結果を、固体試料の場合にはng/g

単位で、液体試料の場合にはng/mi単位で次表2に示す。

なお、表中の試料の名の会社名、地名等は、当該試料の入手先、産地をさす。かかる記載がない品はスーパーストアー・セブンの神奈川県は久井郡中野町店で購入した品で、製造者が不明なものを指す。

表2

試料 (固体)	リムラステスト陽性 細胞質量 (ng)
<u>育子植物</u>	
松の実 (興農園)	1.26
穀質系小麦種子 (千葉製粉)	2,250
穀質系小麦粉 (千葉製粉) (分子量5000以上)	1,000,000
穀質系小麦粉 (千葉製粉)	7,500
小麥ふすま (千葉製粉) (分子量5000以上)	300
小麥胚芽 (千葉製粉)	1,600

小麥胚芽 (千葉製粉)

(分子量5000以上)	<10,000
玄米	1,100
米粉 (日の本粉)	
(分子量5000以上)	31,000,000
米ぬか	29,000
米ぬか (分子量5000以上)	500,000
コーンフラワー (大洋肥料)	
(分子量5000以上)	<0.3
コーングリッツ (大洋肥料)	
(分子量5000以上)	120
コーン (和光食品)	200
クマザ (関本製粉)	15,000
アメメ (種子)	3,300
ニンニク (諸葉)	70
アスパラガス (芽)	4,500
ミョウガ (花房)	41,000
ヨクイニン (ウチダ和根葉)	2,300
ハンゲ (松浦農業)	5,500
バクモントウ (柏木天南堂)	4,000

ターメリック (エスビー食品)	195,000	トマト (生の実)	10,500
<u>豆子類</u>			
大豆 (三女食品)	150	カイワレディコン (根を除く)	50,000
大豆 (ほくれん) (分子量 5000 以上)	400	マタタビ (九久物産)	40,000
丹波黒大豆 (和光食糧)	85	アマチャスル (K.K. 梶井)	73,000
小豆 (和光食糧)	450	ドクダミ (滋賀重量当たり)	
小豆 (和光食糧)		(帝京大学薬用植物園)	1,200
(分子量 5000 以上)	36,000,000	胡麻 (白) (エスビー食品)	2,300
ひなし豆 (和光食糧)	800	トウガラシ (興南貿易)	2,300
大正金時 (和光食糧)	550	ハナ (興南貿易)	5,500
大福豆 (和光食糧)	350	ナツメグ (ライオン)	2,000
そら豆 (生)	750	トウヒ (ウチダ和漢園)	8,000
ジガイモ (ほくれん)		カッコン (朽木天園堂)	3,000
(分子量 5000 以上)	<0.3	甘草 (ウチダ和漢園)	18,000
ピワ (種子)	800	ニンジン (ウチダ和漢園)	45,000
アボガド (種子)	950	ボウフウ (朽木天園堂)	50,000
モモ (種子)	4,500	カンボウイ (朽木天園堂)	800,000
クルミ (種子)	1,900	チョウトウコウ (ウチダ和漢園)	7,000
ソラ豆 (種子)	750	スギナ (滋賀重量当たり)	700
カボチャ (種子)	10,000	(帝京大学薬用植物園)	

ゼンマイ (関本物産)	10,000	エビオス	250,000
<u>ソク類</u>			
わかめ (三井天然品)	11,000	モ虫夏草	240,000
わかめの芽株	200,000		
ひじき (生)	85,000	リムウスステスト属性	
芽ひじき (小糸本店)	105,000	試料 (液体)	瓶詰質量 (mg)
コブ (ヤマトカハシ)	235,000	ビール	
アサクサノリ (乾燥生ノリ)	130,000	キリン ファインビルスナー	1,150
クロレラ		ラガービール	1,250
(ヘルスター・ジャパン Y.S)	1,900,000	ハートランド	1,550
(マンナンフーズ Y.S)	1,000,000	ファインドラフト	1,400
<u>蘆薈</u>			
蘆薈 (下仁田産)	16,000	アサヒ スーパーイースト	600
えのき茸 (長野県中野市)	20,000	ワイン	
しめじ (静岡郡宮城町)	40,000	サントリー サントキージュ (白)	1.3
まいたけ (大利田)	205,000	(赤)	2.4
あわじ茸 (羽生)	8,000	シードル (アップル)	9.00
マッシュルーム	20,000	日本酒	
きくらげ	75,000	大関二郎 (大関酒造)	2.4
ナメコ	21,000	貴族二郎 (貴族酒造)	1.7
		大東珍鹿二郎 (玉東當酒造)	2.1
		玉糸酒	

日タ一號（大同酒店）	1.2
黒豆酒	—
和興園デルカップ（和興園本舗）	1.2
桃園	—
宝焼酎（宝酒造）	<2.0
その他の	—
キヨーレオビン（清水製薬）	6.00
ニシニク抽出液（清水製薬）	3.60

実験例2

A. 内因性TNF産生促進能の測定

①各群3匹のマウス（7週齢のメスC3H/H_e平均体重25g）の尾静脈に、プライマーとしての各液体を経口投与（各液体を200μlの蒸留水に溶解して、経口針で胃内に直接に投与）し、その後は、上記静注の場合と同様に処理した。結果を、各群3匹の平均として添付図面の第4図に示す。

3H/H_e、平均体重29g。の尾静脈に、プライマーとしての実験例1で得られた粉末A-α₂を様々な量で含む生理的食塩水0.2mlを注射し、その3時間後にトリガーとしての1.OKE又は3.OKEのOK-432を生理的食塩水に溶解して濃度を0.2mg/mlとし、同じく尾静脈より投与した。トリガー投与の2時間後に血清を採取し、L929細胞に対する毒性和に基づいてTNF活性を測定した。結果を、各群3匹の平均として添付図面の第8図に示す。

第6図から、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質が内因性TNF産生促進能を発揮する量には最高量があることが推測される。

②別途、各群3匹のマウス（9週齢のオスC3H/H_e、平均体重27g。）の尾静脈に、プライマーとしての実験例1で得られた粉末A-α₂を溶解した生理的食塩水0.2ml（大興園LPS量に換算して1mgの本発明のリムラステスト陽性植物細胞質を含む）を注射し、その3時間後にトリガーとしての1.OKE又は3.OKEの

の2時間後に血清を採取し、L929細胞に対する毒性和に基づいてTNF活性を測定した。結果を、各群3匹の平均として添付図面の第4図に示す。

この図から、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質がOK-432と同程度の内因性TNF産生促進能を示すことは明確である。又、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質が内因性TNF産生促進能を発揮する量には最高量があることも推測される。

③別途、各群3匹のマウス（7週齢のメスC3H/H_e、平均体重25g）に、プライマーとしての各液体を経口投与（各液体を200μlの蒸留水に溶解して、経口針で胃内に直接に投与）し、その後は、上記静注の場合と同様に処理した。結果を、各群3匹の平均として添付図面の第5図に示す。

この図から、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質が経口投与によっても内因性TNF産生促進能を示すことは明確である。

④別途、各群3匹のマウス（12週齢のオスC

3H/H_e、平均体重29g。）の尾静脈に、プライマーとしての実験例1で得られた粉末A-α₂を様々な量で含む生理的食塩水0.2mlとして、同じく尾静脈より投与した。トリガー投与の2時間後に血清を採取し、L929細胞に対する毒性和に基づいてTNF活性を測定した。結果を、各群3匹の平均として添付図面の第7図に示す。第7図において、横軸は、プライマーとトリガーとの投与間隔を示す。

第7図から、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質が最高の内因性TNF産生促進能を発揮するには、プライマーとトリガーとの投与間隔を考慮すべきことが推測される。

B. 内因性TNF産生能の測定

①各群3匹のマウス（9週齢のオスC3H/H_e、平均体重27g。）の尾静脈に、プライマーとしての実験例1で得られた粉末A-α₂を溶解した生理的食塩水0.2ml（大興園LPS量に換算して1mgの本発明のリムラステスト陽性植物細胞質を含む）又は生理的食塩水のみ0.2ml（対照群）を注射し、その3時間後にトリガーとしての0~10mgの粉末A-α₂を生理的

食塩水に溶解して溶液を 0.2 ml として、同じく尾静脈より投与した。トリガー投与の 1 時間後に血清、肝臓、脾臓、肺を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいて TNF 活性を測定した。結果を、各群 3 匹の平均として添付図面の第 8 図に示す。第 8 図において、左上は血清の、右上は肝臓の、左下は脾臓の、右下は肺のデータを示す。

第 8 図から、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質がトリガーとしても有用であることが明らかである。

②別途、各群 3 匹のマウス（9 遅齢のオス C3H/Hc。平均体重 29 g。）の尾静脈に、次表 3 に示す種々の TNF (1,000 単位) をプライマーとして含む生理的食塩水 0.2 ml 又は生理的食塩水のみ 0.2 ml (対照群) を注射し、その 3 時間後にトリガーとしての 1 ml の実施例 1 で得られた本発明の粉末 A-a を生理的食塩水に溶解して溶液を 0.2 ml として、同じく尾静脈より投与した。トリガー投与の 1 時間後に血清を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいて TNF 活性を測定した。結果を、各群 3 匹の平均として添付図面の第 9 図に示す。図中、○は本発明のリムラステスト陽性植物細胞質である実施例 1 の粉末 A-a の、●は大腸菌 LPS のデータを示す。又、▲は粉末 A-a 及び大腸菌 LPS の、L929に対する直接毒性を示す（共に値が 0 であった）。

第 9 図から、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質の内因性 TNF 產生能が大腸菌 LPS と

て TNF 活性を測定した。結果を、各群 3 匹の平均として添付図面の第 9 図に示す。

表 3

使用したプライマー

① TNF-S-AM2 (特開平 1-86784 号公報の実施例 1 に記載)

マウス TNF- α (前開ブロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー 82, 8060~8064 頁、1985 年、に記載)

サイモンズル TNF-S-AM (Blochermistry International, vol. 18, No. 3, 501~508 頁、1989 年、に記載)

第 9 図から、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質の内因性 TNF 產生能が、プライマーとして各種 TNF を使用することにより、およそ 30 倍になることが明らかである。

同程度であることが明らかである。

第 11 図は、第 10 図に示された本発明のリムラステスト陽性植物細胞質の内因性 TNF 產生能と、リムラステストにより測定された本発明のリムラステスト陽性植物細胞質の含量とを対数正規確率紙に示した図である。

第 11 図から、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質の含量と内因性 TNF 產生能との相関度が極めて高いこと、従って、又、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質が内因性 TNF 產生能を有することは明らかである。

C. リン酸の相違による TNF 產生能変動。

復生能への影響

① 各群 2 匹のマウス（7 遅齢のオス C3H/Hc。平均体重 25 g。）の尾静脈に、リムラステスト陽性度 1 又は 3 μ g の CHF を含む生理的食塩水 0.2 ml を注射し、その 1 時間後に血清を採取し、L929 細胞に対する毒性に基づいて TNF 活性を測定した。結果を、各群 2 匹の平均として次表 4 に示す。

表-4

トリガー	TNF活性 (単位/mg)
生理的食塩水(対照)	0
粉末A-a	1.4±0.1
CHF(リン数1/分子) 1 μg	13.0±0.1
CHF(リン数1/分子) 3 μg	59.0±0.0

②各群2匹のマウス(7週齢のオスBALB/c, 平均体重26g.)の尾静脈に、プライマーとしての、リン数が1分子当たり3個と推定されるCHFの1ng(リムラス活性量)を含む、又はそれを含まない生理的食塩水0.2mlを注射し、その3時間後にトリガーとしてのIKEのOK-432を生理的食塩水に溶解して濃度を0.2mgとして、同じく尾静脈より投与した。トリガー投与の2時間後に血液を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいてTNF活性を測定した。

結果を、各群2匹の平均として次表6に示す。

表-6

被体	TNF活性 (単位/mg)
CHF - CHF	20±17
大腸菌LPS - 大腸菌LPS	20±13

上記表4～6に示された結果から、CHFの分子中にリンは最低1個あれば、TNF産生促進能、産生能が低下することはないと推定される。

実験例3 (TNF産生細胞過剰作用の測定)

上記実験例1で得られた粉末A-aを生理的食塩水に溶解し、得られた0.2mgの懸濁液(20μgの本角卵のリムラステスト陽性植物細胞質を含む)を各群2匹のマウス(雄性マウス)を用いて7日齢のBALB/c雄マウス、平均体重24g.)の尾静脈に注射し、その後6時間に

結果を、各群2匹の平均として次表7に示す。

表-7

プライマーとしてのCHF(リン数3/分子)の投与量(nug)	TNF活性 (単位/mg)
0	4.7±1.4
1	56.0±16.0

③各群2匹のマウス(7週齢のオスBALB/c, 平均体重26g.)の尾静脈に、プライマーとしての、リン数が1分子当たり3個と推定されるCHFの1ng(リムラス活性量)、又は大腸菌LPSの1ngを含む生理的食塩水0.2mlを注射し、その後3時間後にトリガーとしての1ng(リムラス活性量)のCHF又は1ngの大腸菌LPSを生理的食塩水に溶解して濃度を0.2mgとして、同じく尾静脈より投与した。トリガー投与の1時間後に血液を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいてTNF活性を測定した。

次に皮膚、難鳴粘液、肝臓、肺、ひら膜におけるTNF産生量の経時変化を、これら各組織抽出液のL929細胞に対する毒性値を指標として測定した。

結果を、各群3匹の平均として添付図面の第12図に示す。第12図において、●は直腸の、▲は腎臓粘液の、△は肝臓の、□は肺の、■はひら膜のデータを示す。

第12図より、腎臓組織でのTNF産生が長時間に渡り持続されることが明らかである。

実験例4 (皮膚投与での免疫抑制活性化能の測定)

A. 内因性TNF産生促進能

①各群2匹の6週齢のオスBALB/cnu/nuマウス(体重18～23g)にプライマーとしての生理的食塩水のみを200ml(A群)か、前記実験例1で得られた1ngの粉末A-aを200mlの生理的食塩水に溶解したもの(B群)を尾静脈から静注する。前記実験例1で得られた粉末A-aを1mg/ml含C60%グリ

セリン水溶液 (C群) を頸部全体に 20 分間隔で 3回又は 6回塗付した (1回塗付量は 100 μ g)。

②静注又は塗付完了の 3時間後にトリガーとしての I.K.E の 0.K - 4.3.2 を尾静脈から静注し、その 2時間後に血糖を採取して、各 20 μ l の L.S.2.0 調定活性に基づいて T.N.P 活性を測定した。結果を各群 2 回の平均として次表 7 に示す。

表 7

A 群	2 単位 / ml
B 群	27.0 単位 / ml
C 群	8 単位 / ml

B. カーボン除去率

①各群 3 匹の 1.0 遅延のオスの BALB/cマウス (平均体重 24 ~ 29 g) の頸部に一日一回、毎日わたって各回 50 μ l の 50% グリセリン水溶液 (A 群) か、前記実施例 1 で得られた粉末 A - a を 1 mg / ml 合成 C 50% グリセリン水溶液 (B 群) か、大腸菌 L.P.S を 2 μ g / ml 合成

50% グリセリン水溶液 (C 群) を塗付し、D 群には 5 日日のみに大腸菌 L.P.S を 1.6 μ g / ml 合成 200 μ l の生理的食塩水を尾静脈より静注した。

②各個体の最後の塗付又は静注の 2 日後に、カーボンとしてロットリングインクアート 581017 (西独ロットリング社製) を生理的食塩水で 0.1% で光学的に測定した。結果を各群 3 匹の平均として次表 8 に示す。

表中、E 群は、カーボン静注直後に採血をした群であり、カーボン除去率が 0.0 の場合に該当する。又、F 群は、正常マウスの血糖 20 μ g の光学的データである (バックグラウンド)。

カーボン除去率は次式に従って、計算した。

$$(1 - \frac{\text{該当群の値} - \text{F 群の値}}{\text{E 群の値} - \text{F 群の値}}) \times 100$$

表 8

群	0.D.2.0 時光度	カーボン除去率 (%)
A	0.547	2.4
B	0.450	5.3
C	0.480	4.4
D	0.320	9.3
E	0.625	0
F	0.296	--

実験所 5 (骨髄成骨活性の測定)

①静注後 18 日目の頸部の左右の頭頂骨 (左右各 1 本存在) を採取し、 ^{14}C a (^{14}C a C 4.2 とし $10.6 \mu\text{Ci} / \text{ml}$) を含む 1 ml の完全合成培地 B.G.J.b - H.W.2 (構成は以下に示す) の入った別々の試験管に入れ、水槽中で 2 時間培養して骨を ^{14}C a で標識した。

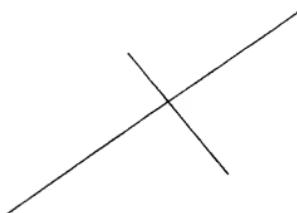
成 分	量 (mg / ml)
L-リジン H.C.t	24.0
L-ヒスチジン H.C.t - H ₂ O	15.0

L-アルギニン H.C.t	7.5
レースレオニン	7.5
レーバリン	6.5
レーロイシン	5.0
レーソロイシン	3.0
レーメチオニン	5.0
レーフェニルアラニン	5.0
レーテリブトファン	4.0
レーテロシン	4.0
レーシスティン H.C.t - H ₂ O	9.0
レーグルタミン	2.00
グリシン	1.50
レーセリン	1.05
レーブロリン	1.15
ニコテン酸アミド	2.0
チアミン H.C.t	4
バントテン酸カルシウム	0.2
リボフラビン	0.2
ビリドキサールリン酸	0.2
葉酸	0.2

ビチオノ	0.2
p-アミノ安息香酸	2
α-リン酸トコフェロール N a	1
塩化コリン	5.0
m-イノシトール	0.2
シアノコバラミン	0.04
N a C a · 乾燥物	8.000
K C l · 乾燥物	4.00
C a C l 2 · 無水	139.7
M g S O 4 · 無水	97.7
N a 2 H P O 4 · 2 H 2 O	60.1
同上 乾燥物	47.9
K H 2 P O 4	1.60
F e C l 3 · 6 H 2 O	0.47
アドウ糖・乾燥物	5.000
(以上の成分を蒸留水に溶解して全量を1.0とした後、以下の成分を添加する)	
牛血清アルブミン	1.0
N a H C O 3	1.400
L-アスコルビン酸 N a	5.0

Iシンチレーター(英國アマシャム社製)に加え、液体シンチレーションにて計数して、培地中の¹⁴Ca放出量を調べた。

④培養後の各種頂骨をP B S (-)で洗浄後、1 m sのI N H C aの入った培養管に移し、密栓後の一観室槽で放置した。培地(各250 μ l)を4.5 m sのA C S I Iシンチレーターに加え、液体シンチレーションにて計数して、骨に残存する¹⁴Ca量(¹⁴Ca残存量)を調べた。結果を各群5試料の結果として次表9に示す。



ベニシリソ G - K 培	1.0
ストレブトマイシン	1.0
フェノールレッド	過量

⑤この後、各種頂骨をP B S (-) (ニッスイ社製)で洗い、次いで、各1 m sの非標識完全合成培地B G J b - H W 2を含む培養管に入れ密栓し、回転培養器を用い、30°Cで一晩培養した。この培養期間中に培地に放出された¹⁴Caは物理化学的の交換反応によるものであり、真的骨吸収活性を反映するものではないと考え、培地は廃棄した。

⑥左右の頭頂骨の一方を、1 m sの非標識完全合成培地B G J b - H W 2のみが入った培養管に入れ、他は、各種濃度の実験例1で得られた本発明のリムラステスト陽性植物被液質である粉末Aを含む1 m sの非標識完全合成培地B G J b - H W 2が入った培養管に入れて密栓し、回転培養器でさらには一晩培養を続けた。

⑦培地(各250 μ l)を4.5 m sのA C S I

表 9

試料	¹⁴ Ca 放出率		T / C 比
	対照群 T	処理群 C	
P T H (/ m s)			
1 単位	3.87	4.46	1.22
粉末 A (/ m s)			
10 μ g	3.84	5.15	1.34
1 μ g	4.47	5.05	1.13
0.1 μ g	3.98	4.06	1.02
0.01 μ g	3.98	3.97	1.00

P T H = 瞬知の骨吸収ホルモンである副甲状腺ホルモンであり、その1単位は約1 μ gに相当する。

上記実験から明らかな通り、粉末Aの結果は用量依存的に高まり、10 μ gの使用で、P T Hの1

表 1-0

以上の効果を拾える。PTHの供給は極めて少なく、しかも高価であるので、粉末A即ち本発明のリムラステスト陽性植物細胞質はPTHの極めて安価な、しかも大量に供給される代替品として使用できる。

実験例6（座卵促進能、卵殻強度増強能の測定）

前記実験例1で用いた粉末Aを水にといて一日当たり約350mlを16日間毎に与え、投与日を含めて30日間に渡り毎日、各鶏の産んだ卵の数、その卵の強度を調べた。なお、実験に当たっては、粉末Aの投与量の相違によって次の3群に分け、1群は各6羽とした。

X群：600mg/mg

Y群：60mg/mg

Z群：水のみ（対照群）

結果を表1-0に示す。

		X群	Y群	Z群
鶏の総産卵数	投与中	80	66	63
（各群6羽の合計）	投与後	85	67	66
	合計S	165	133	129
4kg/cm ² 以上の強度	投与中	29	17	9
を示した鶏群の数（各群6羽の合計）	投与後	24	17	7
	合計T	63	34	16
T/S × 100(%)		32	26	12

表1-0より、次の3点が明白である。

①本発明のリムラステスト陽性植物細胞質である粉末Aを投与したX群、Y群においては、それを投与しないZ群の場合よりも、産卵数が増加している。特に、X群の場合は1.3倍（165+129）に達している。従って、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質には座卵促進能があると判断される。

②本発明のリムラステスト陽性植物細胞質である粉末Aを投与したX群、Y群においては、それを投与しないZ群の場合に比べ、産卵数が占め、卵殻強度が4kg/cm²以上である卵の数の割合が2倍以上になっており、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質には、優れた卵殻強度増強能があると判断される。

③上記座卵促進能、卵殻強度増強能は投与中止後も持続されるので、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質の活性には留れた持続性があると判断される。

性別、投与間隔、毒性

本発明のリムラステスト陽性植物細胞質を免疫調節活性化剤として、或いは、動物用免疫調節活性化剤として投与するさいの量、投与間隔は、免疫調節活性化剤の本質上、当然、担当医師或いは獣医師により、患者の年齢、症状、産生TNF量から推定できる投与効果を踏まして個別に決定されるが、人間の成人（50kg）では、100%純度の本発明の場合は0.1~200μgが、1回投与量の一応の目安となる。

なお、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質は、純度95%の單品の場合、6週齢のマウス3匹（BALB/c、オス、体重1.9~2.3g）に50mg/kgを静注後48時間経過したが死亡例はなく、又、人間の成人（50kg）1人当たり1.5g（活性成分量）を摂取しても特に急性毒性は検察されなかつた。なお、大鼠用LPSの上記と同様マウスにおけるLD₅₀は8.4mg/kgであるので、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質は安全性が極めて高いと言える。

【発明の効果】

本発明のリムラステスト陽性植物細胞質は、従来の免疫機能活性化剤とは異なり、原料が人間その他の動物が常食しているものなので安全性の問題は少なく、従って、化学療法効果が大きい。又、静注のみならず、経口投与、皮膚塗布もできるので投与上の便宜が大である。加えて、安価である。

更に、以上に述べたような特長を持つゆえに、特別の注意を払うことなく、本法により容易に医薬、動物薬、検査薬、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、肥料その他の主成分として或は一成分として配合することができる。

4 図面の簡単な説明

第1図は、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質をガスクロマトグラフィーにかけて得られる、分子中における脂肪酸の存在を示すピークを図示したチャートである。

第2図は、大腸菌LPSをガスクロマトグラフィーにかけて得られる、分子中における脂肪酸の

存在を示すピークを図示したチャートである。

第3図は、百日咳菌LPSをガスクロマトグラフィーにかけて得られる、分子中における脂肪酸の存在を示すピークを図示したチャートである。

第4図は、静注した場合の、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質の、内因性TNF産生促進剤を、対照及び従来の免疫機能活性化剤との対比で示すグラフである。

第5図は、経口投与した場合の、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質の、内因性TNF産生促進剤を、対照及び従来の免疫機能活性化剤との対比で示すグラフである。

第6図は、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質を内因性TNF産生促進剤として使用する量の産生促進作用発現における用量依存性を示すグラフである。

第7図は、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質を内因性TNF産生促進剤として使用する量の産生促進作用発現における産生促進剤/産生剤投与量の用量依存性を示すグラフである。

第8図は、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質の内因性TNF産生能を示すグラフである。

第9図は、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質の内因性TNF産生能が、産生促進剤として各種TNFを使用すると飛躍的に増大することを示すグラフである。

第10図は、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質の内因性TNF産生能を、大腸菌LPSとの比較で示すグラフである。

第11図は、第10図に示された本発明のリムラステスト陽性植物細胞質の内因性TNF産生能と、リムラステストによる当該細胞質の含量とを対照正確度基準に示した図である。

第12図は、本発明のリムラステスト陽性植物細胞質の、TNF産生作用の強度作用を示す図である。

第13図において、○は内因性TNF産生剤(0K-432)の投与量が1.0KEの、●はそれが3.0KEの場合のTNF活性を示す。

第14図において、○は内因性TNF産生促進剤

として生理的食塩水、内因性TNF産生剤として本発明のリムラステスト陽性植物細胞質を使った場合の、○は内因性TNF産生促進剤、内因性TNF産生剤として本発明のリムラステスト陽性植物細胞質を使った場合の内因性TNF産生量を示す。左上のグラフは血清の、右上のグラフは肝臓の、左下はひ臍の、右下は肺のデータを示す。

第15図において、○は本発明のリムラステスト陽性植物細胞質の、●は大腸菌LPSのデータを示す。▲は本発明のリムラステスト陽性植物細胞質及び大腸菌LPSの、LB29細胞に対する直接毒を示す(共に値は0である)。

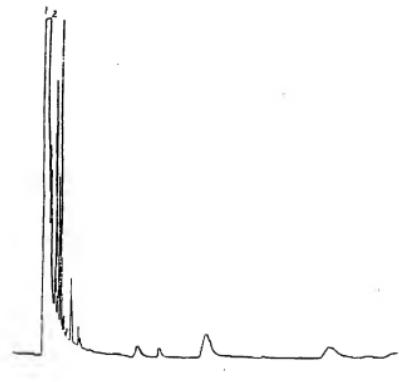
第16図において、○はTNF活性を、●はリムラステスト陽性植物細胞質の含量を示す。

第17図において、○は血清の、▲は腎臓組織の、△は肝臓の、□は肺の、■はひ臍のデータを示す。

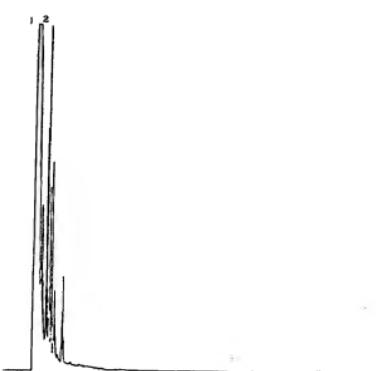
特許出願人 千葉製粉株式会社

代表者 須藤 俊樹 (ほか2名)

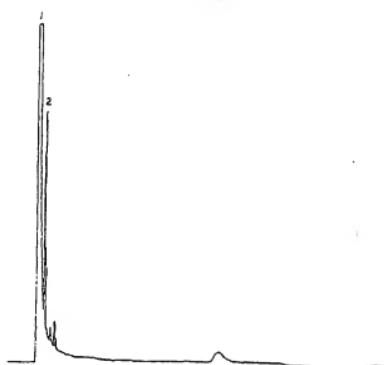
第1回



第2回



第3回



第4回

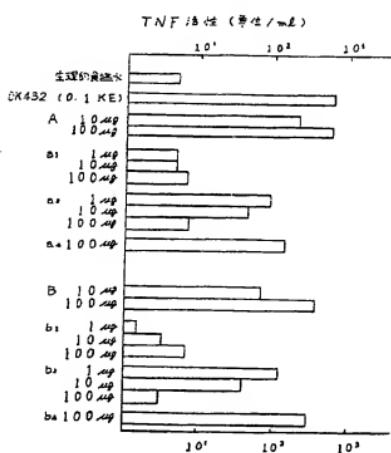


図 5

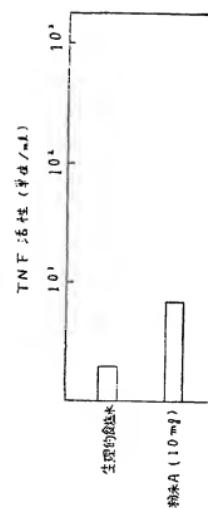


図 6

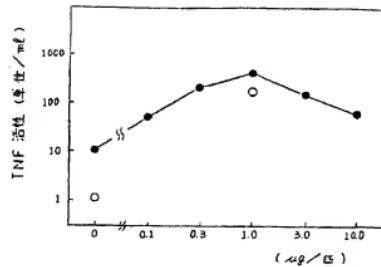


図 7

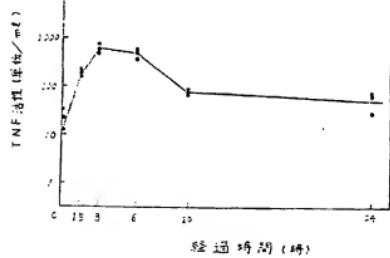
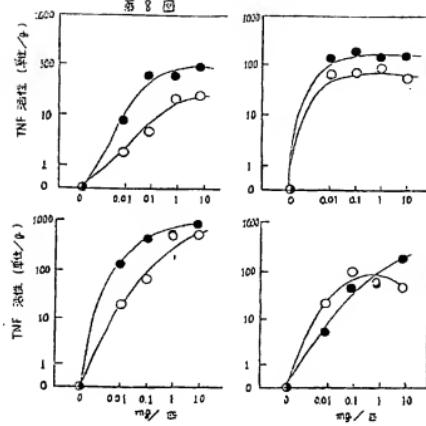
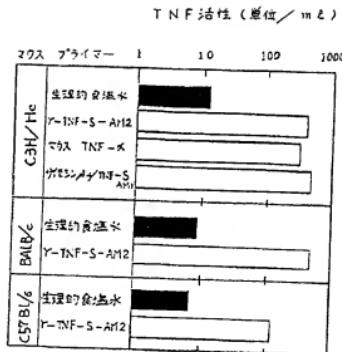


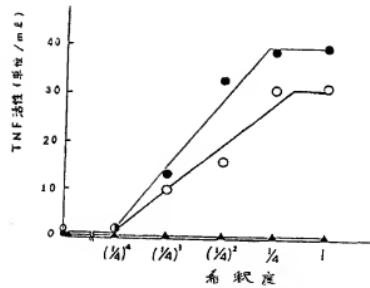
図 8



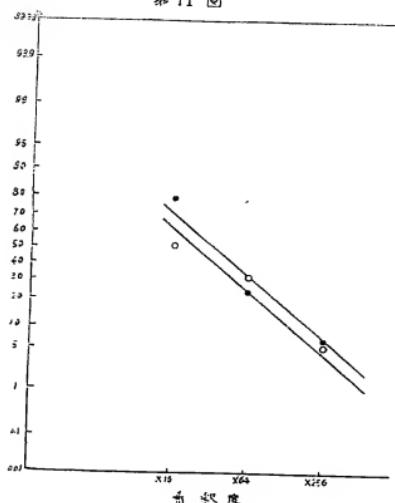
第 9 図



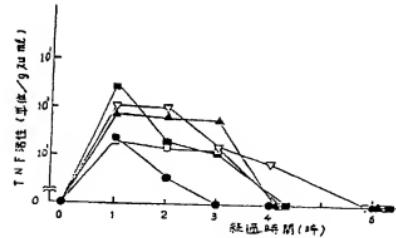
第 10 図



第 11 図



第 12 図



第1頁の続き

⑤Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号
A 23 L 1/30	B	8114-4B
2/00	A	6977-4B
A 61 K 7/00	J	9051-4C
	K	9051-4C
// C 12 P 37/20	ABD	8615-4C
19/04	A	8214-4B
(C 12 P 19/04)	B	8214-4B
(C 12 R 1:89)		
(C 12 P 19/04)		
(C 12 R 1:645)		

優先権主張 ⑤平1(1989)10月2日⑤日本(JP)⑤特願 平1-255210

⑦発明者 水野 伝一 神奈川県鎌倉市岡本18

⑦発明者 大島 治之 東京都八王子市館町1097 館ヶ丘団地 2-10-513

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.